

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑲ Numéro de dépôt: 82401735.4

⑤① Int. Cl.³: **G 01 N 33/92**

⑳ Date de dépôt: 27.09.82

③① Priorité: 28.09.81 FR 8118220

④③ Date de publication de la demande:
06.04.83 Bulletin 83/14

⑥④ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE GB IT LI LU NL SE

⑦① Demandeur: BIOMERIEUX, Société Anonyme dite
Marcy l'Etoile
F-69260 Charbonnières les Bains(FR)

⑦② Inventeur: Trouyez, Gérard
30, rue Chazière
F-69004 Lyon(FR)

⑦③ Inventeur: Alcindor, Louis-Gérald
22, rue du Sergent BaCHAT
F-75012 Paris(FR)

⑦④ Mandataire: Hufenus, Christiane et al,
CABINET BEAU DE LOMENIE 55, rue d'Amsterdam
F-75008 Paris(FR)

⑥④ Procédé et réactifs de séparation sélective des lipoprotéines de faible densité (LDL) et de quantification de leurs composants.

⑥⑦ Procédé de précipitation sélective des lipoprotéines de faible densité (LDL) dans les liquides biologiques ou les extraits tissulaires, par un réactif contenant un ou des polyanions avec ou sans cations divalents, auquel on a ajouté un détergent tel qu'un polymère d'alcools ou d'amines bifonctionnels, des alkyl- ou aryl-éthers de ces polymères, des sels d'acides gras et des sels d'acides biliaires. Dans le précipité, qui peut être redissous par un agent chélatant, on dose les constituants des LDL, tels que cholestérol et phospholipides, par les procédés habituels.

Procédé et réactifs de séparation sélective des lipoprotéines de faible densité (LDL) et de quantification de leurs composants.

La présente invention concerne la séparation et le dosage des lipoprotéines de faible densité (LDL) à l'aide d'un réactif précipitant adapté, et le dosage des composants qu'elles renferment.

La maladie athéromateuse, cérébrale ou cardiaque, représente un fléau des sociétés occidentales par les séquelles invalidantes et la mortalité qu'elle entraîne.

Les études, dans le domaine des facteurs favorisants, voire déclenchants, de cette maladie multiforme, ont montré l'importance de l'obésité, l'hypertension, le tabagisme et l'hyperlipidémie.

L'hyperlipidémie est caractérisée par l'augmentation de certaines classes de lipoprotéines, particules complexes associant des protéines spécifiques, ou apoprotéines du cholestérol libre ou estérifié des triglycérides et des phospholipides.

Le rôle des lipoprotéines est, dans l'organisme, de véhiculer les triglycérides, source d'énergie pour les cellules et le cholestérol, constituant important de leurs parois. En cas d'apport excessif de cholestérol, celui-ci peut s'accumuler et provoquer l'obstruction du réseau circulatoire.

Il est connu que l'augmentation du taux de cholestérol total n'est que médiocrement en corrélation avec le risque d'athérosclérose.

En effet, certains patients développent des signes précoces d'athérome, bien que leur cholestérol soit compris dans les limites de la normale (ROSSNER et al. 1978, 2, 577-579), alors que d'autres présentent un risque minime malgré un taux élevé de cholestérol (AVOCARO et al. Clin. Chim. Acta, 1977, 77, 139-145).

Les acquisitions sur le métabolisme du cholestérol ont permis d'expliquer ces différences en montrant le rôle "épurateur" des HDL (ou lipoprotéines de haute densité) :

- SCHWARTZ et al. Science 1978, 200, 62-64 et le rôle athérogène des (LDL) ou lipoprotéines de faible densité.
- JENKINS et al. Brit. Med. J, 1978, 298, 633-634
- BROWN et al. Science 1976, 191, 150-154; les VLDL ou lipoprotéines de très faible densité et les chylomicrons étant peu ou pas athérogènes.

Ainsi, bien qu'il soit souhaitable de déterminer le taux de cholestérol lié aux LDL, il n'existe actuellement aucune technique fiable, utilisable en routine et dont le coût abordable rende son utilisation possible, dans le domaine du dépistage et de la prévention du risque athéromateux.

La précipitation des chylomicrons, des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et basse densité (LDL) à l'aide de polyanions avec ou sans cations divalents a été précédemment décrite : BURSTEIN M. et SCHOLNICK M.R. et MORFIN R.J. Lipid. Res. 1970, 11, 583 et permet le dosage du cholestérol lié aux HDL. Les polyanions utilisés pour cette précipitation sont choisis parmi les suivants : héparine, polyéthylèneglycols, phosphotangstates, sulfate de dextrane et analogues.

La demanderesse a cherché à empêcher la précipitation des VLDL et chylomicrons et HDL, et à faire en sorte que les seules LDL soient précipitées.

Il a été découvert selon l'invention qu'il était possible de rendre le réactif précipitant connu, comprenant un ou des polyanions avec ou sans cations divalents, sélectif de la précipitation des LDL.

L'invention consiste donc à adjoindre aux réactifs précipitant les VLDL, LDL et chylomicrons, un ou plusieurs détergent(s) anionique(s), cationique(s) ou non ionique(s) dont le poids moléculaire est de préférence supérieur à 200.

Comme détergent(s), on utilisera soit des polymères d'alcools ou d'amines bifonctionnels linéaires ou cycliques sur lesquels peuvent être greffés des alkyl- ou aryl-éthers, soit des sels d'acides minéraux, tels que les polyphosphates ou des polysulfonates, soit des sels d'acides gras, soit des sels d'acides biliaires ou tout autre détergent ou agent tensio-actif adapté.

Parmi les polymères d'alcool utilisables comme détergents figurent les polyéthylèneglycols à longue chaîne tels que le polyéthylèneglycol 6000 et les éthers de polyéthylèneglycol tels que le Triton X-100 ; ces détergents sont additionnés aux réactifs de précipitation à la concentration de 0,5 à 10 g/litre

et de préférence 2 g/litre.

Le réactif de précipitation peut également contenir un polyéthylèneglycol qui joue le rôle de polyanion. Dans ce cas, sa concentration est beaucoup plus élevée, c'est-à-dire de 5 à 30 % (soit 50 à 300 g/litre de réactif) et on doit ajouter au réactif un détergent autre qu'un polyéthylèneglycol, par exemple un éther de polyéthylèneglycol tel que le Triton X-100, ou des sels biliaires, à la concentration de 0,5 à 10 g par litre.

Selon une variante, les divers constituants des réactifs selon l'invention sont stabilisés de façon appropriée et permettent de provoquer la précipitation des LDL dans les liquides biologiques ou les extraits tissulaires.

Les réactifs obtenus ont été tout d'abord testés sur des lipoprotéines plasmatiques obtenues à partir, soit de sujets normaux, soit de sujets hospitalisés pour infarctus du myocarde, et séparées par ultracentrifugation préparative; les LDL sont collectées entre les densités de 1,025 et 1,05, les HDL entre 1,063 et 1,21, les VLDL entre 1,006 et 1,019 selon les techniques habituelles.

La pureté de ces fractions a été confirmée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à gradient de concentration, le cholestérol est dosé par la technique de ALLAIN, les phospholipides par la technique de TAKAYAMA, les triglycérides par la technique de BUCOLO et DAVID, les apoprotéines à l'aide d'antisérums spécifiques en immunoélectrophorèse, immunodiffusion radiale et immunoprécipitation.

La cinétique de la précipitation des LDL peut être également suivie par la mesure de l'augmentation de la turbidité à 620 nm.

Le précipité de LDL est dosé par des opérations consistant :

- soit à apprécier la quantité de LDL précipitant par une mesure turbidimétrique ou néphélométrique,
- soit à doser la quantité d'un des constituants des lipoprotéines précipitées, ce constituant pouvant être le cholestérol non

estérifié, le cholestérol estérifié, le cholestérol total, les triglycérides, les phospholipides, les apoprotéines.

On a constaté que :

- 1) les fractions pures de LDL sont précipitées par le réactif selon
5 l'invention décrit ci-dessus ;
- 2) les fractions de chylomicrons, VLDL et HDL ne précipitent pas et se retrouvent dans le surnageant ;
- 3) le sérum ou plasma humain ou animal, traité par ce réactif, donne un précipité ; seules les LDL sont retrouvées dans ce précipité ;
- 10 4) le précipité obtenu, solubilisé, dialysé et soumis à l'ultra-centrifugation analytique, se comporte comme une fraction LDL ;
- 5) le précipité renferme de l'apoprotéine B, du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides dans des proportions identiques à celles décrites pour les LDL ;
- 15 6) les taux de cholestérol, phospholipides, apoprotéines, obtenus avec le précipité, sont en corrélation satisfaisante avec les taux obtenus pour des lipoprotéines de faible densité séparées par ultracentrifugation, ceci tant pour les sérums d'individus normaux que pour des sérums de patients hospitalisés pour
- 20 infarctus du myocarde, ou toute autre affection.

Il a été obtenu un défaut de précipitation pour des patients présentant des taux de triglycérides supérieurs à 7 mmol/l, mais ces individus ne font que rarement d'accident vasculaire, ainsi que l'ont souligné les différentes études épidémiologiques.

- 25 Le précipité de LDL, obtenu selon le procédé de l'invention, et séparé par décantation ou centrifugation lente peut être dissous par un agent chélatant tel que l'EDTA ou l'EGTA, l'acide iminodiacétique, les citrates et oxalates de sodium et de potassium et de préférence le citrate de sodium à une
- 30 concentration de 1 à 100 mmol/l, et de préférence à 10 mmol/l.

Le précipité de LDL peut également être dissous par une combinaison d'un agent chélatant et d'un détergent.

- Les constituants des LDL ainsi solubilisés, à savoir le cholestérol libre ou estérifié, les triglycérides, les phospho-
- 35 lipides et apoprotéines peuvent alors être dosés selon les techniques habituelles.

Le réactif de solubilisation du précipité de LDL selon l'invention peut également permettre le dosage de ces constituants par l'un des procédés exposés ci-dessus.

Selon une variante, le réactif selon l'invention permet la solubilisation du précipité de LDL et le dosage du contenu de celui-ci en cholestérol. Un tel réactif est caractérisé par le fait que la solubilisation est due à la présence de chélatant (de préférence le citrate de sodium), associé à un détergent (de préférence le Triton X-100) qui libère le contenu en cholestérol. Le cholestérol est ensuite oxydé par la cholestérol-oxydase, le peroxyde d'hydrogène formé étant mis en évidence par la réaction de TRINDER, la présence ou l'absence de cholestérol estérase dans le réactif permettant de doser soit le cholestérol total, soit le cholestérol non estérifié du précipité de lipoprotéines de basse densité.

D'autre part, le dosage du cholestérol des LDL peut être pratiqué directement sur le culot de précipitation des LDL selon l'invention, à condition d'ajouter au réactif utilisé pour le dosage enzymatique du cholestérol une quantité de 1 à 100 mmol/l, de préférence 10 mmol/l, de citrate de sodium.

Ainsi, les réactifs "cholestérol enzymatique PAP 100" ou "cholestérol enzymatique PAP 250" ainsi modifiés sont-ils utilisables pour le dosage direct du cholestérol des LDL contenus dans le culot.

Le dosage des phospholipides des LDL peut être également pratiqué directement sur le culot de précipitation, à condition de modifier le réactif "phospholipides enzymatiques 150" de la même façon qu'indiqué ci-dessus pour le dosage du cholestérol.

On peut enfin envisager un système de réactifs composé d'un ou plusieurs réactifs de précipitation des lipoprotéines de faible densité et un ou plusieurs réactifs de dosage des lipoprotéines ainsi précipitées.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

EXEMPLE 1

Le réactif précipitant les LDL consiste en une solution

- d'héparine dont la concentration est choisie entre 150 et 250 kilounités USP/l, de préférence 183 kilounités USP/l, associée au chlorure de manganèse, de 12 à 120 mmol/l, de préférence 92 mmol/l, et à un détergent qui est le polyéthylèneglycol 6000 ou le Triton X-100 dont la concentration peut varier de 0,5 à 10 g/l, de préférence 2 g/l, ou un sel biliaire à la concentration de 0,5 à 5 g/l.

- 100 µl de sérum sont mis en contact pendant 5 à 60 min, de préférence 30 min, avec 1 ml de ce réactif précipitant. Le mélange est centrifugé pendant 15 min à 3000 g, le précipité décanté est solubilisé par une solution de NaCl 0,15 M, additionné d'EDTA ou de citrate de sodium 0,15 M. Ce précipité resolubilisé peut être analysé par les techniques décrites plus haut. Il contient les LDL.

EXEMPLE 2

- 15 La méthodologie est identique, mais le chlorure de manganèse est remplacé par le chlorure de calcium à la même concentration.

On obtient le même résultat.

EXEMPLE 3

- 20 Le réactif précipitant est constitué par une solution de sulfate de dextrane 500, dont la concentration est choisie entre 10 et 200 g/l, de préférence 50 g/l, associé au chlorure de calcium à 2,5 g/l, les détergents utilisés étant identiques à ceux mentionnés dans l'exemple 1, dans les mêmes limites de concentration.

- 25 On obtient le même résultat.

EXEMPLE 4

- 30 On utilise une solution de polyéthylèneglycol 6000 dont la concentration est choisie entre 5 et 30 %, de préférence 15 %, associée à un sel biliaire dont la concentration est de 0,5 à 5 g/l, de préférence le taurodésoxycholate de sodium (1-3 g/l).

200 µl de ce réactif et 200 µl de sérum sont mis en contact 30 min, puis le mélange est centrifugé 5 min à 3000 g. Le surnageant séparé est analysé. Le précipité contient les LDL.

EXEMPLE 5

- 35 On utilise une solution de phosphotungstate de sodium dont

la concentration est choisie entre 10 et 100 g/l, de préférence 40 g/l, et de chlorure de magnésium à 100 g/l.

- 5 Les sels biliaires ou les alcools polyéthoxylés ci-dessus sont ajoutés aux concentrations ci-dessus (respectivement 0,5 à 5 g/l et 0,5 à 10 g/l).

500 μ l de sérum et 50 μ l de réactif précipitant sont mélangés et incubés 10 min à température ambiante. Le mélange est centrifugé 15 min à 5000 tr/min. Le précipité contient les LDL.

EXEMPLE 6

- 10 On utilise une solution de sulfate de dextrane 500 dont la concentration est choisie entre 0,1 et 10 g/l, de préférence 0,4 g/l, associée au chlorure de calcium entre 0,1 et 20 mmol, de préférence 10 mmol/l, et au taurodésoxycholate choisi entre 0,1 et 10 g/l, de préférence 0,8 g/l.

- 15 50 μ l de sérum sont mélangés à 500 μ l de réactif précipitant, incubés pendant 15 à 60 min à température ambiante, le mélange est centrifugé 20 min à 5000 g, le culot obtenu contient les LDL.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de précipitation sélective des lipoprotéines de faible densité dans les liquides biologiques ou les extraits tissulaires, sans précipiter, le cas échéant, les lipoprotéines de haute densité, par un réactif contenant un ou des polyanions tels que
5 1'héparine, les polyéthylèneglycols, l'acide phosphotungstique, un sulfate de dextrane ou analogue, associé(s) ou non à des cations divalents, caractérisé en ce que, pour éviter la précipitation concomittente des lipoprotéines de très basse densité et/ou des chylomicrons, on utilise un réactif contenant, en combinaison avec
10 les éléments ci-dessus, un détergent anionique, cationique, ou non-ionique.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit détergent est de poids moléculaire supérieur à 200.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2,
15 caractérisé en ce que l'on utilise comme détergent combiné soit des polymères d'alcool ou d'amines bifonctionnels linéaires ou cycliques sur lesquels peuvent être greffés des alkyl- ou aryléthers, soit des sels d'acides minéraux, tels que les polyphosphates ou des polysulfonates, soit des sels d'acides gras, soit des sels d'acides
20 biliaires.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le détergent est présent dans le réactif de précipitation à la concentration de 0,5 à 10 g/l.
5. Procédé de dosage des LDL, caractérisé en ce qu'on
25 précipite les LDL par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, on sépare ce précipité, par exemple par centrifugation lente, après quoi on effectue les opérations suivantes consistant :
 - soit à apprécier la quantité de LDL précipitant par une mesure turbidimétrique ou néphélométrique,
 - 30 - soit à doser la quantité d'un des constituants des lipoprotéines précipitées, ce constituant pouvant être le cholestérol non estérifié, le cholestérol estérifié, le cholestérol total, les triglycérides, les phospholipides, les apoprotéines.

6. Procédé de dosage des LDL selon la revendication 5, caractérisé en ce que le précipité obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 est d'abord dissous.
7. Procédé de dosage selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite dissolution du précipité met en jeu des agents chélatants, tels que les citrates et oxalates de Na et de K, l'EDTA, l'EGTA, l'acide iminodiacétique, associés ou non à des détergents.
8. Réactif de précipitation sélective des LDL à base d'un ou de polyanion(s) tels que l'héparine, les polyéthylèneglycols, l'acide phosphotungstique, un sulfate de dextrane ou analogue, associé(s) ou non à des cations divalents, caractérisé en ce que, pour éviter la précipitation concomittente des lipoprotéines de très basse densité et/ou des chylomicrons, ce réactif contient également un détergent anionique, cationique ou non-ionique.
9. Réactif selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit détergent est de poids moléculaire supérieur à 200.
10. Réactif selon l'une quelconque des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que l'on utilise comme détergent combiné soit des polymères d'alcool ou d'amines bifonctionnels linéaires ou cycliques sur lesquels peuvent être greffés des alkyl- ou aryl-éthers, soit des sels d'acides minéraux, tels que les polyphosphates ou des polysulfonates, soit des sels d'acides gras, soit des sels d'acides biliaires.
11. Réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que le détergent est présent à la concentration de 0,5 à 10 g/litre.
12. Réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il contient de l'héparine, ou un phosphotungstate, un sel d'un cation bivalent, associés à un détergent choisi parmi les polyéthylèneglycols, les éthers de polyéthylèneglycols et les sels biliaires.
13. Réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il contient du polyéthylèneglycol 6000 à la concentration de 50 à 300 g/l associé à un détergent choisi parmi les éthers de polyéthylèneglycol et les sels biliaires.

14. Réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il contient du sulfate de dextrane et des ions calcium associés à un sel biliaire, de préférence le taurodésoxycholate.
- 5 15. Réactif de dissolution du précipité de LDL obtenu par l'emploi du réactif selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé en ce qu'il contient au moins un agent chélatant, tel que les citrates et oxalates de Na et de K, l'EDTA, l'EGTA, l'acide iminodiacétique et de préférence le citrate de sodium, à la concentration de 1 à 100 mmol/litre.
- 10 16. Réactif selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il permet à la fois la solubilisation du précipité de LDL et le dosage de celui-ci selon les procédés indiqués dans la revendication 5.
17. Réactif selon la revendication 16, permettant à la fois
- 15 la solubilisation du précipité de LDL et le dosage du contenu de celui-ci en cholestérol, caractérisé en ce qu'il contient un chélatant (de préférence le citrate de sodium), associé à un détergent (de préférence le Triton X-100).
18. Procédé de dosage direct du cholestérol dans le précipité
- 20 de LDL obtenu selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on additionne au réactif utilisé pour le dosage enzymatique du cholestérol de 1 à 100 mmol/l et de préférence 10 mmol/l de citrate de sodium.
19. Procédé de dosage direct des phospholipides dans le
- 25 précipité de LDL obtenu selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on additionne au réactif utilisé pour le dosage enzymatique des phospholipides de 1 à 100 mmol/l, et de préférence 10 mmol/l de citrate de sodium.
20. Un système de réactifs composé d'un ou de plusieurs
- 30 réactifs de précipitation des lipoprotéines de faible densité et un ou plusieurs réactifs de dosage des lipoprotéines ainsi précipitées.